

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

昭61-500201

⑬ 公表 昭和61年(1986)2月6日

⑭ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求
C 12 P 17/04 C 12 N 1/00 C 12 N 1/10		7732-4B 6712-4B 6712-4B Ⅱ	部門(区分) 1 (1)

(全 16 頁)

⑯ 発明の名称 アスコルビン酸の生物転化による製造

⑰ 特 願 昭59-504007

⑱ 出 願 昭59(1984)10月18日

⑲ 翻訳文提出日 昭60(1985)6月20日

⑳ 国際出 願 PCT/US84/01695

㉑ 国際公開番号 WO85/01745

㉒ 国際公開日 昭60(1985)4月25日

優先権主張 ㉓ 1983年10月20日 ㉔ 米国 (U S) ㉕ 543975

⑳ 発 明 者 ロランド, ジョン・フランシス アメリカ合衆国イリノイ州60025, グレンビュー, インディアン・ロード 735

㉑ 発 明 者 カイル, セオドア アメリカ合衆国ウィスコンシン州53217, フォックス・ポイント, ノース・ビーチ・コート 7451

㉒ 出 願 人 クラフト・インコーポレーテッド アメリカ合衆国イリノイ州60025, グレンビュー, ウォーキーガ・ン・ロード 801, クラフト・コート

㉓ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名

㉔ 指 定 国 DK, J P, U S

最終頁に続く

## 請 求 の 範 囲

(1) レーガラクトン酸、レーガラクトン酸低級アルキルエステル、レーガラクトノール・ガンマラクトンおよびこれらの混合物よりなる群から選択されるレーガラクトン酸系物質、ならびにエタノール、グリセロールおよびこれらの混合物よりなる群から選択される炭素エネルギー源を含む生物転化用水性培地を用意し；前記炭素源培地に、該炭素源からレーアスコルビン酸を過剰生産しかつ該炭素エネルギー源を利用できる微生物を加え；そして好気的条件下に前記微生物を培養して該炭素エネルギー源を消費させかつレーアスコルビン酸を蓄積させる；ことからなるレーアスコルビン酸の製造方法。

(2) 炭素エネルギー源がエタノールであり、レーガラクトン酸系物質がレーガラクトノール・ガンマラクトンである請求の範囲第1項記載の方法。

(3) 生物転化用水性培地が該微生物の増殖に必要な窒素源および適量な無機物質を含み、さらにレーアスコルビン酸の生産を高めるのに十分な量のグリセリンを含む請求の範囲第1項記載の方法。

(4) 生物転化用水性培地が該培地の全重量を基準にして少なくとも約0.5重量%のグリセリンを含み、該培地のpHが約2.5-6.5の範囲である請求の範囲第3項記載の方法。

(5) 前記生物転化を少なくとも約20%の酸素飽和度の好気的条件下で行う請求の範囲第1項記載の方法。

(6) 前記微生物がカンディダ属酵母であるか、あるいは突然変異株（例えば無外膜、巨細胞、エトロジグアエジン、カフエ

イン、アフリカフリンもしくはその他の化学的または物理的突然変異株）または組換えDNA技術によつて誘導される突然変異株である請求の範囲第1項記載の方法。

(7) エタノールおよびレーガラクトン酸系物質が既知副産物のラクトース源または付着性のペクチンから誘導される請求の範囲第1項記載の方法。

(8) カエー、ホエー透過物またはミルダ透過物をレーガラクトースおよびエタノールに転化し、該レーガラクトースを酸化してレーガラクトン酸となし、該レーガラクトン酸を還元してレーガラクトン酸系物質を得る請求の範囲第7項記載の方法。

(9) レーガラクトン酸がペクチンの酵素的加水分解により誘導され、該レーガラクトン酸を還元してレーガラクトン酸系物質を得る請求の範囲第7項記載の方法。

(10) レーガラクトン酸をラネニブケル、白金またはパラジウム触媒および水素で還元してレーガラクトン酸を得る請求の範囲第9項記載の方法。

(11) レーガラクトン酸を脱水してレーガラクトノール・ガンマラクトンを形成する請求の範囲第7項記載の方法。

(12) 前記微生物をバッチ法、連続法、半連続法、フェド・バッチ法 (fed-batch)、灌漑法または他の再循環法で行つてレーアスコルビン酸を生産する請求の範囲第1項記載の方法。

(13) 前記微生物を適当な支持体を用いて固定するかまたは封じ込める請求の範囲第1項記載の方法。

(14) 前記炭素源培地がレーアスコルビン酸の生産を最大限に増加させかつその他のアスコルビン酸類似体の生産を最小限に抑

えるような組合せで生体素餌としてのエタノール、*Ｌ*-ガラクトトノーガンマラクトンおよび他の有機成分ならびに無機成分を含む、請求の範囲第1項記載の方法。

03 イオン交換樹脂を用いて発酵ブロスまたは養分液から*Ｌ*-アスコルビン酸を回収する請求の範囲第1項記載の方法。

04 *Ｌ*-アスコルビン酸産生性でありかつ組織膜およびミトコンドリア膜を横切つて*Ｌ*-アスコルビン酸を輸送することができる微生物。

05 カンディダ ノルベゲンシス (*Candida norvegensis*) CBS 2145 の変異株よりなる群から選択される請求の範囲第1項記載の微生物。

06 該微生物がカンディダ ノルベゲンシス MY-55 (ATCC 20686) およびその変異株または誘導株よりなる群から選択される請求の範囲第1項記載の微生物。

07 エタノールおよび*Ｌ*-ガラクトトノーガンマラクトンを含む生物転化用培地を用意し；該発酵培地でカンディダノルベゲンシスMY-55株(ATCC 20686)、カンディダノルベゲンシスMY-78株(ATCC 20732)またはこれらの誘導株もしくは変異株の酵母を好氣的に培養して、エタノールを消費させかつ*Ｌ*-ガラクトトノーガンマラクトンを*Ｌ*-アスコルビン酸へ転化させる；ことかなる*Ｌ*-アスコルビン酸の生産方法。

08 該微生物がカンディダ ノルベゲンシスMY-78 (ATCC 20732)およびその変異株または誘導株よりなる群から選択されと請求の範囲第1項記載の微生物。

#### 造方法。

09 炭素エネルギー源がエタノールであり、*Ｄ*-ガラクトンロン酸系基質が*Ｄ*-ガラクトンロン酸低級アルキルエステルである請求の範囲第25項記載の方法。

10 前記微生物がカンディダ ウチルス (*Candida utilis*) NRRL Y-900 およびその変異株または遠位の誘導株よりなる群から選択される請求の範囲第25項記載の方法。

11 約0.01～2.0重量%のエタノール、約0.1～0.7重量%の*Ｌ*-ガラクトトノーガンマラクトン、約0.1～0.8重量%のグリシンと共に炭素源および必須無機質混合物を含み、約6.5～2.5のpHを有する*Ｌ*-アスコルビン酸生産用培地。

12 少なくとも約 $1.5 \times 10^{-1}$  (ミクロモル/分/μ(蛋白質))の活性を有する固定化した*Ｌ*-ガラクトトノー1,4-ラクトンオキシダーゼ酵素を用意し；該固定化酵素を、少なくとも約2.0ミクロモルの*Ｌ*-ガラクトトノー1,4-ラクトンを含む生物転化用培地と接触させ；固定化酵素と接触している排水性培地中の酸素濃度を少なくとも約3.0 ppmに保つて*Ｌ*-ガラクトトノー1,4-ラクトンを*Ｌ*-アスコルビン酸へ転化させ、そして該*Ｌ*-アスコルビン酸を回収する；ことかなる*Ｌ*-アスコルビン酸生産のための生物転化方法。

13 前記生物転化用培地のpHが約6.0～7.5である請求の範囲第22項記載の方法。

14 前記固定化酵素をビーズの形で担体カラムに加え、そして該カラムに前記培地を通す請求の範囲第23項記載の方法。

15 *Ｄ*-ガラクトンロン酸、*Ｄ*-ガラクトンロン酸低級アルキルエステルおよびこれらの混合物よりなる群から選択される*Ｄ*-ガラクトンロン酸系基質、ならびにエタノール、グリセロールおよびこれらの混合物よりなる群から選択される炭素エネルギー源を含む生物転化用培地を用意し；該発酵培地に、該基質から*Ｌ*-アスコルビン酸を生産しかつ該炭素エネルギー源を利用できる微生物を加え；そして該微生物を好氣的に培養して炭素エネルギー源を消費させかつ*Ｌ*-アスコルビン酸を製

#### 明 細 書

##### アスコルビン酸の生物転化による製造

本発明は*Ｌ*-アスコルビン酸(ビタミンC)の発酵による製造方法、この種の発酵に特に関連する微生物および発酵培地に関する。

##### 発明の背景

*Ｌ*-アスコルビン酸は人間にとって必須食品成分であり、自然界においては柑橘類の果物および植物中に含まれている。*Ｌ*-アスコルビン酸は通常既知方法により、例えば出発物質として*Ｄ*-グルコースを用いるライヒシュタイン (T. Reichstein) の米国特許第2,681,811号に記載の方法により合成される。*Ｌ*-アスコルビン酸のその他の化学的合成方法および生物学的製造方法も種々知られており、例えば米国特許第2,702,808号、同第2,847,421号および同第3,721,663号に記載の方法が知られており、これらは一般に上記のライヒシュタイン方法の改良である。しかしながら、これらの方法は開示されるごく出発物質としてグルコースを用いる比較的複雑な方法である。他の出発物質を利用する商業規模での新法方法が望まれるであろう。

英国特許第763,056号に記載される化学的・生物学的の方法では、動物または植物の酵素組織に存在するデヒドロゲナーゼ (E.C.1.3.2.3)を用いてガンマラクトンの最終酸化を行うことにより*Ｌ*-アスコルビン酸を得ている。同様の方法が米国特許第4,259,443号に記載されており、ここではラクトースの加水分解とエンドリ基由来の植物デヒドロゲナーゼ酵素

(801.3.2.3)を利用してレーアスコルビン酸を製造している。この方法の効率については開示されていないが、商業規模でのこの方法の使用は問題を生ずると思われる。

パン酵母および/またはビール酵母がレーガラクトノラクトンオキシダーゼ(膜)を含むことはすでに知られており、この酵素(膜)がレーアスコルビン酸合成の最終酸化工程、すなわちレーガラクトノラクトンマラクトン酸を酸化してレーアスコルビン酸と過酸化水素とを製造する工程を担うと思われる[エンサイクロプア(Enzyologia), 31, 42(1966); ユーロ、ジエイ、バイオケム、(Eur. J. Biochem.), 127, 391(1982); およびエム、ニシキミ(M. Nishikimi)らのアーチ、バイオケム、バイオフィジ、(Arch. Biochem. Biophys.), 191, 479(1978)を参照]。炭素エネルギー源としてD-グルコース(10%)を含む培養培地内で増殖する酵母がエンジオオール製造のアスコルビン酸類似体を生産する能力についても研究された[ヘイク(Helik)らのカナ、ジエイ、マイクロバイオロ、(Can. J. Microbiol.), 18, 597(1972)を参照]。類似の研究において、カンディダ(Candida)酵母株を蔗糖、ヘキソースまたはペントース上で増殖させてアスコルビン酸類似体(D-エリトロアスコルビン酸)を製造した[エス、ムラカワ(S. Murakawa)らのアグリク、バイオロ、ケム、(Agric. Biol. Chem.), 40(6), 1255(1976)および同書41(9), 1799(1977)を参照]。レーガラクトノラクトンマラクトン酸を培地に添加して酵母を増殖させた場合にはレーアスコルビン酸も産生された。D-

エリトロアスコルビン酸は種々の炭素源から作られたが、レーアスコルビン酸は発酵培地中にレーガラクトンが存在するときに生産されるにすぎなかった。

また、かなりの量のラクトースはチーズ製造の際の副産物としてホエー(乳清)、ホエー透過物またはミルク透過物の形で利用可能であることが知られている。これらの副産物の利用は長い間チーズ製造業者らにとつて関心の的であつた。

ホエーまたは他のミルク由来の流動状副産物から得られるラクトースを加水分解するとグルコースおよびガラクトースが得られることは以前から知られており(例えば本発明特許第282650号、同第2826503号、同第2749242号および同第2681858号を参照)、またホエーを発酵させるとエタノールが生ずることも知られている(例えばワード・エンジニアリング(Food Engineering), 11月, 1977年, 74-75頁; 英国特許第1524618号を参照)。従来副産物としてのラクトースを利用するのに適したレーアスコルビン酸の新規製造方法がとりわけ望まれるであろう。

従つて、本発明の主な目的はレーアスコルビン酸を製造するための商業規模で実施しうる新規生物転化方法を提供することである。本発明の他の目的は、副産物であるラクトース(例えばホエー、ホエー透過物およびミルク透過物)をレーアスコルビン酸の製造に利用しうる方法を提供することである。本発明のさらに他の目的は、レーガラクトノラクトンマラクトンのような種々のD-およびレーガラクトース誘導体の存在下にエタノールの好氣的発酵によりレーアスコルビン酸を製造する

ことができる微生物を提供することである。さらに他の目的はレーアスコルビン酸の微生物学的製造に特に適する発酵培地を提供することである。これらおよび他の目的は添付の図面および以後の詳細な説明から一層明らかになるであろう。

#### 図面の説明

第1図は本発明に従つて商業副産物であるラクトースからレーアスコルビン酸を製造する方法の1つの実施例を示す一連の工程図であり、

第2図はレーガラクトノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ活性についてのミトコンドリア検定を示すグラフであり、

第3図はレーガラクトノ-1,4-ラクトンからのミトコンドリアでのアスコルビン酸製造を温度の関数として示すグラフであり、

第4図はレーガラクトノ-1,4-ラクトンからのミトコンドリアでのアスコルビン酸製造をpHの関数として示すグラフであり、

第5図はレーガラクトノ-1,4-ラクトン基質濃度に対するミトコンドリアでのレーアスコルビン酸反応速度  $V_0$  を示すグラフであり、そして

第6図はレーガラクトノ-1,4-ラクトンからのミトコンドリアでのアスコルビン酸製造についての  $K_m$  および  $V_{max}$  を測定する際の逆基質濃度に対する逆ミトコンドリア反応速度  $V_0$  を示すグラフである。

#### 発明の説明

一般に本発明によれば、レーガラクトノラクトンマラクトン、

レーガラクトン酸の低級アルキルエステル、レーガラクトン酸およびこれらの混合物よりなる群から選ばれるレーガラクトン酸系基質の水相中で好氣的生物転化によるレーアスコルビン酸の製造方法が提供される。以後にさらに詳しく論じるように、レーガラクトン酸系基質は適当な方法で、例えばレーガラクトースの酸化および付着類似に含まれるペクチンのようなペクチン質の加水分解により得られる。特に好適なレーガラクトン酸系基質はレーガラクトノラクトンマラクトンである。また、この種の方法によれば、エタノール、グリセロールおよびこれらの混合物よりなる群から選ばれる種類の炭素発酵エネルギー源をその発酵において利用することができる。特に好適な炭素源はエタノールである。

好氣的生物転化に適する微生物の選択および利用は本方法の重要な特徴になつている。これに関して、レーアスコルビン酸の合成において過剰生産性でありかつレーガラクトン酸系基質からレーアスコルビン酸を蓄積する微生物を発酵培地に供給することが望ましい。レーアスコルビン酸の合成において過剰生産性である微生物とは、自然突然変異または遺伝子操作のいずれかによつて発酵プロセスの全容量に達する発酵培地1.5倍より少なくとも約0.3%量で代謝産物としてのレーアスコルビン酸の高められた生産が可能である微生物を意味する。

レーアスコルビン酸の生産は特定の微生物を用いてレーガラクトン酸系基質の存在下にエタノールを発酵させることにより実施される。レーガラクトン酸系基質からのレーアスコルビン酸の製造において過剰生産性でありかつ経路炭素源を利用し

る酵母およびカンディダ属の特定酵母が特に好ましい。しかし、他の適当な微生物（適切に遺伝子修飾された微生物を含む）、例えばハンセンラ (Hansenula)、サツカロミセス (Saccharomyces)、クリエペロミセス (Kluyveromyces)、デバロミセス (Debaryomyces)、ナソニア (Naosonia)、リポミセス (Lipomyces)、トルロプシス (Torulopsis)、クレンラ (Kloeckera)、ピチア (Pichia)、ソゾナンカロミセス (Schizosaccharomyces)、トリゴノプシス (Trigonopsis)、ブレツタノミセス (Brettanomyces) またはシュワニオミセス (Schwanniomyces) のような他の属の酵母もいくつかの場合では使用することができる。

本発明の他の観点によれば、使用する微生物は酸化の段階における主な炭素源としてエタノールを利用することができ、その結果レーガラクトノーガンマラクトンの生物転化を行って少なくとも約 2/3 の収量でレーアスコルビン酸を生産することができるものであればよい。しかし、カンディダ属に属し、かつレーアスコルビン酸の生産に必要とされる特性を有し、さらに生物転化プロセスへの生産物の輸送および好気的条件下でのアルコールの高められた代謝能力などの特性を有する突然変異株が好適な微生物である。しかし、ある場合には細胞内に有意量の生産物を蓄積する株も利用価値がある。また、特に好適な炭素源はエタノールであるが、グリセロールも増殖用炭素源および/またはレーアスコルビン酸もしくはその他のエンジオール化合物の生産用炭素源として有用であることが認められている。炭素源を選ぶための決定的要因はそれがレーアスコ

ルビン酸の異性体へ転化されないということである。酵母はそれらがレーアスコルビン酸を生産しかつ蓄積する能力を有するものでありさえすれば自然界に存在する株、人工的に突然変異を起こされた株または遺伝子操作により作られた株であつてよく、とりわけカンディダ属のものが好適である。

適切な突然変異株は紫外線 (UV) の照射およびまたは化学的突然変異原（例えばモノメチル-N-ニトロ-N-エチル-N-ニトロソアミン、メチルスルホン酸エチル、亜硫酸、アクリラジンおよびカフエイン）への暴露のような通常の突然変異方法により誘発される。組換え DNA 技術もそうであるが、プロトプラスト融合または電気融合を行って改良された組換え体を作るところの遠隔生産性酵母株のハイブリダイゼーションも使用できる。また、多くの属の酵母は適当な条件下でレーアスコルビン酸またはその類似体を生産するように誘導されることが認められている。アスコルビン酸の製造において遠隔生産性のこの種の株はアスコルビン酸の大部分を細胞内に蓄積してもよく、従つて細胞の自己分解が起こるまでアスコルビン酸は放出されない。しかし、レーアスコルビン酸を発酵地から非常に簡単に回収する発酵方法においては、微生物が生産物を増大へ輸送するのが望ましい。

従つて、本発明の特徴はレーアスコルビン酸生産物を細胞内に保持することなく、むしろ生産場所から発酵地中へ輸送できる特定の微生物株を提供することである。レーガラクトノーガンマラクトン基質からのレーアスコルビン酸の製造に携わる酵素系は酵母のミトコンドリアと関係があるように思える。従

つて、レーガラクトノーガンマラクトン基質は発酵地から細胞壁を横切り、さらにミトコンドリア膜を通過して輸送されなければならない。同様に、レーアスコルビン酸の生産物はミトコンドリア膜と細胞壁とを通過して発酵地中へ入るよう運ばなければならない。レーアスコルビン酸を発酵地中に蓄積させるために、細胞壁とミトコンドリア膜を通過することのような望ましい輸送特性を有する微生物株が提供される。これに関して、本発明の特に好適な実施形態では、レーアスコルビン酸またはその類似体生産物の大部分をトロポ相 (tropophase) およびイデオ相 (idiophase) の生長段階中に発酵地中へ輸送するときの従て述べるカンディダ属突然変異株のような選ばれた酵母株および株が利用される。本発明によれば、レーガラクトン酸基質（特にレーガラクトノーガンマラクトン）を好氣的に酸化してレーアスコルビン酸を製造しかつ実質的にそのレーアスコルビン酸のみを蓄積するのに特に適した新規微生物が提供される。エタノールを好氣的条件下で代謝する優れた能力をもつ微生物であつて、かつレーアスコルビン酸を水性発酵地中に供給するように細胞壁とミトコンドリア膜を横切つてレーアスコルビン酸を輸送できる微生物が特に好ましい。

エタノール含有標準発酵地 (SM-1) および特別のグリシン含有増地 (グリシン増地)（各増地は 0.5 重量部のレーガラクトノーガンマラクトンもまた含有する）で増殖させるとき、レーアスコルビン酸を生産しかつ蓄積する人工的に突然変異を起こさせた酵母の特に好ましい例はカンディダ ノルベグンシ ス タフト社 MF-56 (Candida Norvegensis Kraft,

Ino, MF-56) である。この菌株はノルウェー州ロッツビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) に ATCC 20686 として寄託された。その他の改良された突然変異株はカンディダ ノルベグンシ ス タフト社 MF-78 であり、この菌株はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに ATCC 20712 として寄託された。これらの酵母株は一連の突然変異誘発方法によつてカンディダ ノルベグンシ ス RO2145 から誘導、単離された突然変異株である。

レーアスコルビン酸遠隔生産性菌株 MF-56 (ATCC 20686) の系図、ならびに標準発酵地およびグリシン発酵地でのレーアスコルビン酸の収量を次の表に示す。

表 1 カンディダ ノルベグンシ スからのレーアスコルビン酸遠隔生産性 菌株の系図			
カンディダ ノルベグンシ ス	生産されたレーアスコルビン酸 (g/L)		グリシン増地
	SM-1		
US 2145 (RMS)	0.09		0.30
MF-27 (UV)	0.015		0.60
MF-34 (UV/DAF)	0.020		0.72
MF-39 (UV)	0.80		0.75
MF-42 (HTC)	0.30		0.69
MF-54 (NA)	0.33		0.73
MF-56 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0.34		0.80
MF-56	0.34		1.07

発酵はエタノール1.5% (重量/容量) およびレーガラクトノ  
ーガンマラクトン0.5% を含有する発酵培地を入れた耐化学光  
線の500mE/エルレンマイヤーフラスコ内で30℃において48  
時間発酵した(400RFU)。先代の菌株から後代の菌株をつ  
くるのに用いた突然変異誘発剤または選択剤を次の略号:  
UV=紫外線; EMS=メチルスルホン酸エチル; NTG=ニ  
ーメアル-β-エトローロ-β-エトログラフィジン; NA=亜硝酸  
酸; CAF=カフェイン; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=レーガラクトン酸ニフケル;  
Kはつてカゴコ内に示す。

レーアスコルビン酸産生性突然変異株のスクリーニング  
方法は、大多数の酵母細胞に対して突然変異誘発処理をし、  
次にアスコルビン酸の生産レベルに基づいて酵母コロニーを選  
択することにより行われる。アスコルビン酸の生産レベルは、  
酸生産に感受性の培養培地で突然変異処理酵母の早期結露を培  
養することにより監視できる。例えば、炭酸カルシウム粉末の  
ような酸感受性物質を用いて培養培地を不透明にする。増殖し  
ている酵母コロニーが酸を生産すると炭酸カルシウムが溶解  
ることによりそのコロニーをとり囲む区域が透明になる。その透  
明区域の直径は酵母コロニーの高められた酸生産の関数として  
増大する。

6. ノルベグンシス MF-39 と命名した表Ⅰの系図の培養物  
の1つに關して、その突然変異誘発処理およびスクリーニング  
のためのデータを次の表Ⅱに示す。

表Ⅰ  
レーアスコルビン酸産生性突然変異株の選択

UV照射 時間 分	酸 量 位					
	0-10	10-15	15-20	20-25	25	2.5
0分	464/468	4/468	—	—	—	—
(100%生存)	98.14%	0.85%	—	—	—	—
15分	300/313	8/313	5/313	—	—	—
(13.6%生存)	95.84%	2.5%	1.59%	—	—	—
30分	443/4480	27/4480	18/4480	2/4480	—	—
(4.8%生存)	8.3%	7%	9%	0.88%	—	—
45分	143/500	50/500	108/500	18/500	1/500	—
(0.32%生存)	6.86%	6%	21.6%	3.6%	0.20%	—
60分	30/87	—	6/87	1/87	—	—
(0.03%生存)	3.45%	—	6.89%	1.15%	—	—
75分	277/288	7/288	2/288	1/288	—	—
(0.1%生存)	9.618%	2.43%	0.69%	0.34%	—	—

表Ⅱに記載の実験において、優れた生産性の突然変異株はそれらの  
酸単位値(AU)を基準にしてスクリーニングした。これに關して、  
突然変異誘発処理後細胞および生存株を指示培地に接種  
し、30℃で96時間インキュベートしてそれらのAU値を  
測定した。この前記の指示培地は還元、エタノール1.5%  
(重量/容量)、レーガラクトノ-ガンマラクトン0.5%、グ  
ルタミン酸/ナトリウム塩0.2%、および不透明化剤として  
のCaCO<sub>3</sub>0.3%を含有するSM-1培地であった。AU値とは  
透明区域の直径(mm)/コロニー区域の直径を意味する。表Ⅱ  
では、その第1欄に0, 15, 30, 45, 60および70秒の突然  
変異誘発UV照射時間を示し、その下のカゴコ内にその照射時  
間での生存培養物のパーセントを示す。各照射時間に関して、  
酸単位値の5つの異なる区域寸法のそれぞれに対する生存コロ  
ーニーの数およびそのパーセントを表Ⅱのそれぞれの欄に示す。  
生産性の界面については表Ⅱに關して述べたような瓶とフラス  
コ試験を用いる。最高の酸単位値を有する突然変異株の中か  
らMF-42株が選ばれた。

すでに示したように、本発明によればレーアスコルビン酸生  
産性菌株の突然変異株ならびにその菌株の系図の誘導株が提供  
されかつ利用される。これに關して、MF-56株(表Ⅱ参照)  
のその後の突然変異は、次の表Ⅲに示すように、レーアスコル  
ビン酸に關してさらに一層産生性突然変異株を提供すべく  
行われる。

表Ⅲ  
MF-56(ATCC 20686)からのレーアスコルビン酸  
産生性突然変異株の系図

カンダイ	ノルベグンシス	生産されたレーアスコルビン酸 (P/L)
MF-56(UV)		1.07
MF-57(UV/Vn+2 Res)		1.10
MF-61(UV)		1.30
MF-61'(0.137)		1.31
MF-64(EtBr)		1.34
MF-72(UV)		1.38
MF-77(UV)		1.43
MF-78		1.77

先代菌株から後代菌株をつくるのに用いた突然変異誘発剤ま  
たは選択剤をカゴコ内に示す。突然変異処理または選択処理  
は次のように行われる: EMS=メチルスルホン酸エチル;  
UV=紫外線; NTG=ニ-メアル-β-エトログラフィジン; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=ニフケ  
ルニフケル; Co137=セシウム137ガンマ線; EtBr=臭化  
エチリウム; Na=亜硝酸; Vn+2=メチルパナツリウム酸アンモ  
ニウム。表Ⅲに記載のレーアスコルビン酸生産量は表Ⅱに關し  
て先に述べたような瓶とフラスコ試験によつて得られる。

0. ノルベグンシス トラフト社 MF-56 突然変異株(ATCC  
20686)、0. ノルベグンシス トラフト社 MF-78 突然変異株  
(ATCC 20732)、および0. ノルベグンシス 0308145  
菌株の形態学的、生理学的ならびに培養上の特性は、'酵母、

分類学的研究 (The Yeasts, a taxonomic study) \* (ジェイ・ロダー (J. Lodder) 編集, 1970年, 北オランダ発行所, アムステルダム) および酵母の新解説書 (A New Key to the Yeasts) † (ジェイ・エイ・バーネット (J. A. Barnett) およびアーノ・ヴェイ・パークハースト (R. J. Parkhurst) 編集, 1974年, 北オランダ発行所, アムステルダム) に示される酵母に関する記述と一致する。形態学的試験および同定試験を表 Ⅱ に示す。

25℃において麦芽エキスを増殖させる場合、細胞は(2~8) × (5~13) ミクロンの円筒形ないし卵形である。コロニーはクリーム色をしており、穴状があり、軟らかく平皿である。ホルクセル (Folwells) のアセテート寒天培地上では子菌胞子を作らない。

表 Ⅱ

炭素の同化			
化合物：			
グルコース	+	エタノール	+
ガラクトース	-	メタノール	-
レーゾルブース	-	グリセロール	+
シネブローシス	-	エトリートール	-
マルトース	-	リビトール	-
セロビオース	+	ガラタナール	-
トレハロース	-	マンニトール	-
ラクトース	-	グルシトール	-
メリビオース	-	メチル-β-D-グルコシド	-
ラフィノース	-	サリシン	+/-
ノレタトース	-	アルブチン	+/-
インシュリン	-	D-乳酸	+
可溶性糖類	-	コハク酸	+
D-キシロース + 存在 または	-	クエン酸	+
レーアラビノース	-	イノシトール	+
D-アラビノース	-	グルコノ-β-D-ガラクトン	-
D-リボース	-	2-ケト-グルコネート	-
レーラムノース	-	5-ケト-グルコネート	-
	-	D-グルコサミン	+

ENO<sub>3</sub> の同化: 陽性

添加ビタミン類なしでの増殖: 陽性; アアミン, ビオチンおよび

びトリドヤンンを必要とする

増殖のための最高温度: 41~45℃

\* 場合によりわずかに同化する

本発明の位の特許は、エタノールからD-グルコース生成の代謝過程を抑制しかつD-エリトロアスコルビン酸の形成を最小限に拘束する水性発酵増殖地ならびにその発酵条件を提供することである。特に好適な水性発酵増殖地はD-アスコルビン酸の回収が簡単でありかつD-アスコルビン酸の微生物学的製造を高めるものである。適当な水性発酵増殖地を提供することは本発明方法にとってかなり重要であり、そして望ましい発酵増殖地の選択および提供は発酵で使用する特定の微生物の選択にも一部関係する。また適当な発酵増殖地の提供は以後に詳しく述べるイオン交換樹脂分離方法を含む分離技術による一層効果的なD-アスコルビン酸の回収方法をも提供する。

発酵増殖地においてエタノールは炭素源として利用され、その初期濃度は使用する特定の菌株に応じて約0.1~2.0重量(%) / 容量(ml) (以後w/vと記す) の範囲が好ましい。エタノールが生物転化中に消費されると、それは酵母が耐えられる濃度でありかつ増殖またはD-アスコルビン酸の生産を阻害しない最高濃度(約0.1~2.0重量(%) / 容量(v/v))へと断続的に補足される。

この種の方法のいろいろな観点によれば、生物転化用の水性増殖地はエタノール、グリセロールおよびこれらの混合物よりなる群から選ばれる4個より少ない炭素原子をもつ炭素源エネ

ルギー源と、D-ガラクトノ-β-D-ガラクトン、D-ガラクトン酸およびこれらの混合物よりなる群から選ばれるD-ガラクトン酸系炭素とを含むものが用いられる。一般に、その発酵増殖地は選ばれた微生物の増殖にとって必要な栄養素をさらに含む。また増殖の pH は約2.5~6.5 の範囲であるのが好ましい。一般に、水性発酵増殖地は、発酵増殖地の全重量を基準にして、少なくとも約0.1重量%, 好ましくは約0.1~2.0重量%の炭素源が加えられるだろう。炭素源は発酵中に消費され、そして発酵期間中に定期的にまたは連続的に添加される。同様に、発酵増殖地の全重量を基準にして少なくとも約0.1重量%の発酵基質がその増殖地に加えられるのが望ましい。酵母による発酵のためには、一般に発酵増殖地は窒素源、種々の無機栄養素および種々の無機物質も含むだろう。

窒素源(一般に水性発酵増殖地の全重量を基準にして約0.1~0.5重量%の量で用いられる)は、それを最大利用するそれぞれの菌株の能力に応じて、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素または水酸化アンモニウムの形のアンモニウムイオンなど、およびこれらの混合物からなる代謝可能な窒素化合物群から選ばれる。培養増殖地または発酵増殖地を調合するにはさらに種々の量のビタミン類(例えばグルタミン酸モノナトリウム塩、グルタミン、アスパラギン酸など)、プリン類(アデニン、チミン)、トコフェロール抽出液、酵母エキス、蛋白質加水分解物のような有機栄養素; Ca, Mg, K, Fe, B, Co, Cu, Mn, Mo, Zn の硫酸塩または塩酸塩のような無機塩; およびビタミン類(例

例えば水溶性のビタミンB類)が添加される。この種の作用を効果的に行う増地の1つに先に述べたSM-1エタノール増地がある。この増地の組成特性は次の通りである。

SM-1 増地	
	量 g/L
A. 炭素-エタノール(重量/容量)	15.0
B. 窒素-尿素	2.0
C. 補助成分-トウモロコシ抽出液	5.0
D. 無機塩	
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{NaCl}$	0.1
$\text{KCl}$	0.1
$\text{H}_2\text{BO}_3$	0.0005
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0002
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0004
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0004
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0004
$\text{KI}$	0.0001
$(\text{NH}_4)_2\text{WO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0002
E. ビタミン-チアミンHCl	0.004
ビオチン	0.00002
F. 生物転化化合物-レーガラクトノ-ガンマラクトン	5.0
G. pH 4.0に調節	

に関して、この種の高グリシン増地はレーアスコルビン酸の収量生産性を約3倍またはそれ以上高めるらしいことがわかった。本明細書に記載の発明において特に有用であることが立証されかつ本明細書で「グリシン増地」として認められるグリシン発酵増地の成分は次の通りである。

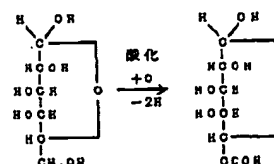
グリシン増地	
成分	量(g/L)
エタノール	20.0
グリシン	7.0
CaL Ⅷ	5.0
グルタミン酸モノナトリウム塩	2.0
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.0
$\text{MgSO}_4$	0.5
無機混合物	2.0ml
上記無機混合物は次の成分からなる:	
EDTA (2Na)	5.0 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.735 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.6725 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.915 g
$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.293 g

選ばれた酵母菌株を適切な培養条件下にこの増地で増殖させると、本質的にレーアスコルビン酸のみがレーガラクトノ-ガンマラクトンの生物転化生成物として増地中に生産される。この増地の発酵増地またはその他の増地(以後詳しく述べる)もより一層有利であることが見出されている。培養条件は一般に約20~37℃の温度範囲、好ましくは約30℃である。生物転化は約6.5~2.5のpH範囲、好ましくは約4.0のpHで行うのが望ましい。最適培養条件は使用するそれぞれの酵母株によって決まるだろう。発酵方法は1~7日間を要し、好氣的条件下に行われる。レーアスコルビン酸を生産する生物転化方法において高濃度の酵母細胞バイオマス(生物転化増地14gあたり25~240gの生物量)を使用する場合、酸素欠乏条件の発生を防ぐためにその通気方法に対して純粋酸素または酸素に富む雰囲気を提供する必要がある。またこうすることが収量を高めるために望ましいかも知れない。水性培養増地は少なくとも約2.5 ppmの酸素を保つようにするのがよく、好適には約3~5 ppmの範囲の所定のレベル以下に酸素含有量を低下させない方がよい。

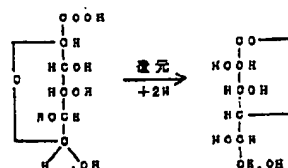
前記のSM-1増地のような標準培養増地は本発明によるレーガラクトノ-ガンマラクトン基質からのレーアスコルビン酸の製造において有利に利用されるが、全ての増地または発酵は、増地の全重量を基準にして少なくとも約0.5重量%(好ましくは約0.6~0.8重量%)のグリシンを含む増地を用いて行うのが特に好適である。増地中の約0.7重量%のグリシンは収量増加という点でとりわけ効果的であることがわかった。これ

高グリシン増地は高グリシン含量のゼラチンのような蛋白質を加水分解し、その加水分解生成物をアスコルビン酸還元生成性微生物用の増地増地の発酵に直接利用することにより商業規模での操作に対して提供される。

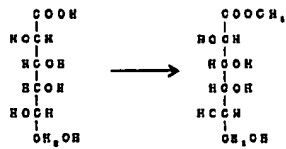
さらに詳しく述べると、レーガラクトン酸系基質はナズ製造または医薬の原料の副産物であるラクトースを加水分解してグルコースとレーガラクトースとなし、次にレーガラクトースを酸化してレーガラクトン酸をつくることにより前記ラクトースから製造するのが望ましい。



レーガラクトン酸はこの他に柑糖類のメクトンなどのペクトン質を加水分解(例えば酵素による加水分解)しても得られる。このレーガラクトン酸は還元してレーガラクトン酸となし、これを炭水してレーガラクトノ-ガンマラクトンを製造する。



レーガラクトン酸の各種誘導体（特に低級アルキルエステルを含む）はレーガラクトン酸の慣用エステル化反応によって製造できる。



特に好適な生物転化方法では、細胞バイオマスを作るための過剰生産性微生物の増殖を、第1段階の発酵として、レーガラクトン酸系基質を含む適当な増殖培地で行い、こうしてその後の生物転化方法で利用するための細胞量を得る。望ましくは、この増殖培地は先に述べたように少なくとも約0.02g/l (2/100ml)の高グリセロール含量を有するだろう。第1段階の発酵はレーアスコルビン酸を直接生産しないので、この増殖用発酵培地はエタノールを含む必要がなく、容易に利用しうる普通の炭素源（例えばグルコース）を用いることができる。第1段階の増殖発酵系（好適には細胞増殖を最大限とすべく処方される）からの細胞バイオマスを回収し、これを使用して高細胞密度の生産転化用培地（この培地は細胞増殖を最大とするように処方される必要がない）を用意する。望ましくは、この高細胞密度の生物転化用培地は、増殖14gあたり少なくとも約5.0g（乾燥細胞重量）、好ましくは約25-100g（乾燥細胞重量）のアスコルビン酸過剰生産性微生物を含むだろう。この

後の高細胞密度系にエタノール炭素源とレーガラクトン酸系基質を加えると、レーアスコルビン酸を高濃度で生産する生物転化反応が生ずる。

生物転化を行う場合に、好気的条件は微生物が基質を酸化して、その微生物学的酸化によってレーアスコルビン酸のみが実質的に生産される条件下に維持される。その後、以後に詳しく述べる適当な方法で好気的発酵により生じたレーアスコルビン酸を回収する。

生物転化の間は好気的条件を保つことが必要であり、これに関して、水性発酵培地は発酵中に少なくとも20g（例えば20-30g）の酸素飽和度（例えば2-3ppmの酸素）を保つようにするのが望ましい。好気的条件は酸素を含む気体を発酵培地を導入し、エアリフト反応器（air lift reactor; 発酵培地中に酸素を効果的に分散する）のような発酵装置を利用することによって維持される。

すでに述べたように、生物転化条件下に主な炭素エネルギー源としてエタノールを利用すると、レーガラクトノールガンマラクトンは実質的に全部レーアスコルビン酸へ転化される。例えば、0.5重量%のレーガラクトノールガンマラクトンを含む50-100g培地中でエネルギー源としてヘキサースル（6-炭素エネルギー源）を用いるよりもむしろエタノール（2-炭素エネルギー源）を用いてカンディダ菌母を増殖させるとき、実質的にレーアスコルビン酸のみが形成されて他のアスコルビン酸類似体（例えばD-エリトロアスコルビン酸）の生産は最小限に抑えられる。このことはレーアスコルビン酸を商業的興味の水

準で生産する実用的方法の実現において重要な要素となる。

生物転化方法において、レーガラクトノールガンマラクトンは細胞内の1種または少数の酵素によって製造的に同族の生成物へと転化される。この方法は増殖しつつある細胞、休止している栄養細胞、乾燥細胞、または各種の有機ポリマー（例えばエーカラジーン、アルギン酸ナトリウム、ポリアクリルアミド、ゼラチン、ゼラチンまたはその他のマクロ孔質物質）あるいは無機化合物（例えば重質石灰およびシリカ）に固定された細胞を用いて行われる。活性酵素を含む細胞のミトコンドリアを生物転化を行わせるべく単純して固定化することもできる。

レーアスコルビン酸の生物転化方法は通常の好気的発酵方法、例えばバッチ法、連続法、半連続法で操作される。また、高密度のバイオマスを得るのに使用できる培養方法、例えば過密培養法、細胞分離器を備えたバッチ法およびフェドバッチ（fed-batch）法も使用でき、この場合は空気への酸素の補足が必要となる。

本発明について一般的に述べたので、本発明の種々の面を今年第1図のプロットダイヤグラムに示す方法の具体例に関してより詳しく説明するであろう。

第1図はホエー、ホエー透過物または乳清透過物のような動物副産物のラクトース溶液基質10からレーアスコルビン酸を製造する方法の1つの実施形態を模式的に示す。動物副産物のラクトース溶液は一般に約4.5-5.0重量%のラクトースを含み、これを加水分解するとグルコース-ガラクトース溶液12の形でその構成成分のグルコースとガラクトースとを生

ずる。この加水分解は*E. fragilis*（*E. fragilis*）または*E. lactus*（*E. lactus*）由来の酵素ラクトーゼ酵素もしくは*A. niger*（*A. niger*）または*A. oryzae*（*A. oryzae*）由来のカビ酵素を用いて慣用方法で行われる。酵素は遊離のもの、封じ込められたものまたは固定されたもののどれを使用してもよい。

グルコース-ガラクトース溶液12またはラクトース溶液10は、アルコール発酵を行う際に必要または所望により慣用方法で蛋白質または無機物質を除去することができる。加水分解処理工程によって得られたグルコース-ガラクトース溶液を濃縮して、例えば溶液の全重量を基準にして約15-20重量%の範囲の固形分を含む溶液を得てもよい。一般に、ラクトース以外の固形分含量は全固形分の約0.5-1.0重量%の範囲であり、従ってこの溶液のグルコースおよびガラクトースの全含有量は溶液の全重量を基準にして約2.0-約2.5重量%の範囲であるのが望ましい。

通常の酵母発酵方法に従ってトウモロコシ皮抽出液または酵母エキスのような適当な栄養素を補足した後、グルコースからのエタノール発酵用の適当な酵母菌株、例えばビール酵母（*S. cerevisiae*）の選ばれた菌株を使用して無気条件下にグルコース-ガラクトース溶液12を発酵させ、発酵培地のガラクトース成分を実質的に消費することなくグルコースをエタノールと二酸化炭素へと転化する。この方法でエタノール-ガラクトース溶液14が得られる。

このエタノール-ガラクトース発酵物は一般に重量/容積高



率で少なくとも約5%のエタノール、および発酵物14の容量および重量濃度で少なくとも約10重量%のD-ガラクトースをそれぞれ含む。発酵物14を蒸留してアルコール16を除去、その後所望によりアルコール16を精製して190ブルーのエチルアルコールを得てもよい。このアルコール18は発酵において使用する選ばれた微生物のための栄養エネルギー源として役立てるために、レーアスカルビン酸発酵方法で利用することができる。

続いて、エタノールの除去後に回収されたD-ガラクトース含有蒸留液をさらに適当な方法で濃縮して、糖液の全重量基準で約20~75重量%の糖類の全固形分含量を有するガラクトース糖液を得る。望ましくは、全糖液重量基準で約16-62重量%のガラクトースを含む。このガラクトース糖液を結晶化すると、精製されたD-ガラクトース18が得られる。所望により、発酵増殖への無機栄養素の補助として、レーアスカルビン酸発酵において無機塩20を利用し得る。また、イオン交換によりガラクトースを発酵成分の残部から分離することもできる。この種のガラクトースは直接反応工程18の原料として役立つ。

D-ガラクトース18は接触酸化によってD-ガラクトン酸22へ転化される。D-糖類のためのこの酸化工程を行う方法は当技術分野でよく知られており、7ライヒンシュタインの米国特許第2265121号に記載されている。従ってD-ガラクトース(アセトン)をD-ガラクトン酸生成物へ転化するには各種の触媒、例えば白金またはパラジウム触媒を使用する。次

に、非保護D-ガラクトン酸を適当な水素添加触媒(例えばラネーニッケルまたはパラジウム)および水素ガスでの還元などの適切な還元工程で還元してレーガラクトン酸24を製造する。この化学的還元方法も当技術分野で知られており、例えばエイチ・イスベル(H. Isbell)のジエイ・レス・ナト・ブル・ストズ、(J. Res. Nat. Bur. Stds.), 33, 45-60(1944)に記載されている。蒸留による水の除去および脱塩し一糖類の場合はレーガラクトノ-ガンマラクトン26を生成させ、これはレーアスカルビン酸を製造するための本発明の微生物学的転化方法において利用される。レーガラクトン酸エスアルおよびレーガラクトン酸のような他のガラクトース誘導体も利用できるが、利用効率が劣るためにレーアスカルビン酸の収量は減少する。5-ケート-レーガラクトン酸のようなケト誘導体は本明細書に記載の好適な酵母菌株によつて利用されない。レーガラクトノ-ガンマラクトン26、エタノール16および適当な有機・無機栄養素を合わせて、選ばれたレーアスカルビン酸産菌生産性菌株用の発酵増殖28を始行する。

レーアスカルビン酸の発酵方法は慣用の種培養発酵器、例えば30リットルのニュー・ブルンスウィック・サイエンティフィック発酵器(New Brunswick Scientific Fermentor)で実施される。生産物形成の監視および細胞環境の制御はマイクロコンピュータへ送附した物理的および化学的センサーを使用してエタノール、圧力、流入量、排気ガス、二酸化炭素、排気酸素ガス、pHおよび溶存酸素を測定することにより行われる。

培養後、発酵によつて生産されたレーアスカルビン酸はいくつかの方法、例えばイオン交換樹脂、吸着またはイオン選別樹脂、活性炭、膜濾-結晶化などを用いることにより高純度の発酵ブロスから回収できる。

発酵の経過は適当な分析方法を用いて監視する。レーアスカルビン酸およびその類似体の定量的検定は、2,6-ジクロロインドンフェノールでの酸化還元-滴定(エス・シー・パートン(H. S. Burton)らのジエイ・アソス・パブ・アナリシス(J. Assoc. Pub. Analysts), 17, 105(1979)を参照)および高性能液体クロマトグラフィー(ジエイ・クロム、(J. Ohren), 196, 163(1980)を参照)ならびに電気酸化還元法(エル・エイ・パナア(L. A. Panola)のアナル・ケム.(Anal. Chem.), 48, 364(1976)を参照)を用いて行われる。アスカルビン酸オキシダーゼ(ベーリンガー・マンハイム(Behringer-Mannheim)社製)の使用をともなう標準的方法も行ふことができる。

発酵ブロス中のレーアスカルビン酸生産量が最大になったとき発酵を終了する。レーガラクトノ-ガンマラクトンの未転化部分は再使用する。

本発明の種々の面を次の実施例に就いてさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

#### 実施例1

30リットルのニュー・ブルンスウィック発酵器を用いて、レーアスカルビン酸製造のための成育バッチ発酵を行った。トウモロコシ抽出液0.25%、塩化アンモニウム0.1%、グリ

シン0.7%、硫酸マグネシウム・7H<sub>2</sub>O 0.05%、グルタミン酸モノナトリウム塩0.2%、エタノール1.5% (v/v)および微量無機質混合液0.30mlから成るグリシン増殖15.4%をpH 4.2に調整して、12.1℃で30分間酸菌した。(なおここに示した値は時に指示がない限り重量%を意味する。)冷却後、低温酸菌したレーガラクトノ-ガンマラクトン0.5%を上記の無菌発酵ブロスに加えた。発酵器には30℃において回転速度とう動(100 RPM)上の2.4エルレンマイヤー・フラスコ内で増殖させたC. ノルベグンシス KCC MF42(株1)の24時間0.1ブロス培養物500mlを接種した。

その発酵器は30℃、250 RPMおよび0.25容量/分の通気速度で運転し、最初pHを4.0に保った。24時間後、上清ブロスは0.084g/lのレーアスカルビン酸を含んでいた。追加の27.0時は酵母細胞中に存在していた。48時間後、澄明なブロスは0.43g/lのレーアスカルビン酸を含み、細胞は2.95g/l含んでいた。使用のイオン交換樹脂による吸着および溶離を行つて生産物を回収し、続いて脱色、再発および結晶化を行った。

#### 実施例2

カンダイダ酵母およびその変異株を用いるレーアスカルビン酸の生産に対して、高密度バイオマスを使用して生産物を回収する方法強化系が開発された。この方法ではKCC MF42酵母細胞を種培養器を用いて8M-1増殖(EtOH 1.5% v/v, レーガラクトノ-ガンマラクトン0.1%)で18時間増殖し、そして無菌条件下に遠心分離した。遠心分離で得られ

光細胞ペーストはその後無菌の新しい8M-1増地(エタノール1.5%, グルタミン酸モノナトリウム塩0.2%, レーガラクトノーガンマラクトン0.5%; pH 4.0)に3.75 g/lの生細胞重量で接種の導入を避けながら再度接種した。そして飽和の6.5%の増地をレベルで培養を通した。レーアスコルビン酸の生産は24時間で0.470 g/lに増え、45時間では0.580 g/lに増大した。酵母中に増地のpHは2.6以下がった。

冷却、殺菌化した発酵ブロス4.5はロームハース(Rohm & Haas)社で製造したイオン交換樹脂、IR120(H+)樹脂の500mlカラムを通した。流出液と洗浄水を集め、100mlの容量になるまで真空下57°Cで蒸発させた。冷エタノール100mlを加えて、析出物(蛋白質)を5°Cで遠心分離(5000RPM)することにより除去した。生産物は再び25mlの容量になるまで蒸発させ、そして結晶化が完了するまで5日間0°Cで保存した。得られた結晶はアセトンで3回洗い、無アルコールに溶解して再結晶した。最初の収量は粗製レーアスコルビン酸結晶(HPLC)が約1.4 g回収された。

この他に、回収および精製は陰イオン交換樹脂(デュエンタス1型)、アセテート形へのブロスからのレーアスコルビン酸の吸着および0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>での洗脱によっても行うことができる。

#### 実施例 II

カンディダ菌およびその実菌株の休止細胞を使用して発酵培養液中でエタノールおよびレーガラクトノーガンマラク

トンからレーアスコルビン酸を生産する方法が開発された。酵母はエタノールとレーガラクトノールの両方を必要とする。得られた細胞は凍結状態で、または種々のポリマーゲルに固定して、もしくはポリマー樹脂や無機化合物へ定着させて使用する。

この実施例では、8M-1増地で18時間培養した酵母細胞カンディダ ノルベグンシス 055 #1911を遠心分離にかけ、凍結培養液(pH 4.5)で洗い、そしてエタノール0.8%およびレーガラクトノーガンマラクトン0.5%を含む0.03%凍結培養液(pH 4.5)50mlあたり生細胞重量3.0%の濃度で再懸濁した。500mlの耐化学薬品のガラス瓶にガラス製エマルシマイヤーフラスコ中に混合物50mlを入れて回転瓶として運転せ、300 RPMで30°Cにおいて通気した。エタノールの利用状況とレーアスコルビン酸の生産状況を追跡するためブロス試料を定期的に採取した。アルコール濃度を約0.3% v/vに保つべくエタノールの添加を定期的に行った。16時間後の酵母によるレーアスコルビン酸の生産結果を表Vに示す。

表 V		
使用した微生物	培養したレーアスコルビン酸	
0. ノルベグンシス 055 #1911	g/l	時間
	90	33
	130	48
	200	73
	260	96

#### 実施例 III

ガラクトース誘導体、好ましくはレーガラクトノーガンマラクトンをレーアスコルビン酸へ転化できる微生物を選択するために、スクリーニングプログラムを開始した。エンゾール化合物を生産しようと報告された種々の酵母からカンディダ属の微生物が選ばれた。

多数のカンディダ種は各地の培養物コレクション、例えばメリーランド州ロフタビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、デルフト(Delft)のセントラルビュロー・フオー・シメルカルチャー(Central Bureau voor Schimmelcultuur)、パリのパスツール研究所(Institut Pasteur)およびイリノイ州ベオリアのノーザン・リージョン・リサーチ研究所(Northern Region Research Lab.)から容易に入手でき、スクリーニング実験の前に培養物入手して精製した。これらの培養物は0.1%斜面増地またはその他の栄養増地で培養した。

0.1%斜面で24時間増殖させた酵母の斜面増地の食塩水懸濁液を接種物として用いた。500mlの耐化学薬品のエマルシマイヤーフラスコ内の無菌8M-1増地(エタノール1.5%、グルタミン酸0.2%)50mlに細胞懸濁液0.5mlを接種が導入しないようにして加えた。レーガラクトノーガンマラクトンを低濃度として待加フラスコに添加した。このフラスコを回転瓶として器上に置き、200 rpm, 30°Cで48時間通気した。殺菌化したブロスはレーアスコルビン酸の生産について試験した。遠心分離にかけて洗浄した細胞ペーストを10%トリクロル酢酸

3.0%で処理し、2,6-クロロインドフェノールで滴定することにより細胞内に存在する還元型化合物の量を測定した。レーガラクトノーガンマラクトンのレーアスコルビン酸への転化は次のカンディダ種において観察され、これを表VIに示す。

2168/50042

學生證

102 社區服務

### 实例 V

エアークリフト発動機は通常の発機一駆動軸発動機に比べていくつもの明らかな利点を有している。中でも、燃費の改善された大量燃送、電力要求量の低減、および積極的に操縦される発動機に存在する高度の耐断力と比べたときより豊かな微生植物環境が挙げられる。これらの特長ゆえに、エアークリフト発動機は工業規模で使用するのに適する。以下の実用例はカンパディア発動機を使ってビュミシロを製造するためのエアークリフト発動機の使用について示す。

4.0 gの実験室規模のエアーリフト発酵槽に、エタノール 2.75 g W/V, グリシン 0.7 g および レーガラクトノース マラクトン 0.5 g を含有する無菌のグリシン増地 (pH 4.1) を接種した。この発酵槽に 1 庫天 (2.5 g) フラスコからの洗浄液 C, ノルベンジンス EOC MF-42 細胞の 2 時間結菌液を接種した。0 時間での生存細胞数は  $5.5 \times 10^6$  個であつた。発酵槽の通気は  $1.9 \text{ 空気} / 1 \text{ 発酵増地} / \text{分}$  (容量/容量/分) に調節し、こうして  $5.0 \text{ m}^3$  のサイクル速度を得た。30℃で24時間後、生存細胞数は  $1.1 \times 10^8$  個に増え、48時間で  $3.0 \times 10^8$  個に、そして72時間では  $2.8 \times 10^8$  個であつた。増殖後91時間で生存細胞数は  $1.7 \times 10^8$  個に達つた。0.72 F/4のレアスコン比度が生産された。

### 实例例 11

同様のエアリフト発弾等を用いる実験で、高細粒密度発弾を行った。この場合には、ノルベグンシス KGCNT-42 の 24 時間生細胞ペーストを 4.0 4 の発弾管内の 8 M-1 培地

(グリシン 0.7 g および L-アラタクトノ-ガンマラクトン 0.7 g 含有) に 100 g/l の量で分散した。酵母の増殖または生産性を限定せず阻害しない量 (0.1~0.3 g) でエタノールを連続的に供給し、1:1 の酸素-空気比で発酵等へ酸素供給を行つた。全混合ガス容量は 1.7 容量/容量/分であつた。これらの条件下において、発酵等の上部区域は 30 g の酵母濃度を維持した。発酵後 20 時間で L-アスコルビン酸は 1.44 g/l 生産された。

#### 実施例 10

この実施例は高細胞密度の生物転化条件を用いる L-アスコルビン酸の製造について示す。カンディダ ノルベグンシス M7-78 タラフ社の菌株 (ATCC 20732, 表 1) および 1 に示す系図を有する) を 3-4 日斜面増殖 (グルコース 0.5 g, トリアセアセーベアト 0.2 g, 酵母エキス 0.5 g, 希釈 1.5 g) 上 30℃ で 24 時間培養した。6 本の斜面増殖から純粋細胞は 30 ml ステンレス鋼製容器内の無菌 8 M-1 グルコース増殖 (グルコース 1.5 g, トウモロコシ抽出液 0.5 g, グルタミン酸モノナトリウム塩 0.2 g, 塩化アンモニウム 0.1 g, グリシン 0.02 g, 脱ラクトースホエー透過物 0.1 g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.05 g, L-アラタクトノ-1.4 ラクトン 0.02 g) 20 g を接種するに使用した。この細胞を 30℃, 200 rpm で培養し、0.5 l 容量/容量/分で 24 時間通気した。

この酵母接種物 (20 g) は、第 1 段階の酵母バイオマス発酵を行つてその後の高細胞密度生物転化で使用する細胞量を得

るために、無菌条件下で無菌 8 M-1 グルコース増殖 492 g を含む 750 ml のステンレス鋼クマツプ (Onsaap) 発酵器へ移した。発酵条件は 30℃、攪拌速度は 200 rpm、そして通気速度は 0.5 l 容量/容量/分であつた。増殖の pH は最初 4.0 に調整し、その後生長相の間 pH 2.6 に降下させた。発酵後 17 時間で培養プロセスを 4℃ まで冷却し、遠心分離によつて細胞を回収した。酵母の増殖は乾燥細胞重量、光学密度 (OD) 680 nm、および標準平板菌数計算用媒体 (Standard Plate Count Agar) (オキシド) 上の全コロニーの平板菌数により監視した。細胞ペーストの平均収量は 1.0 g/l であつた。エタノールを炭素源として増殖させた酵母からの細胞ペーストの収量も同じであつた。これらの細胞は第 2 段階の L-アスコルビン酸製造のための生物転化方法において使用した。

L-アラタクトノ-1.4 ラクトンに L-アスコルビン酸へ転化する生物転化方法は、脱ラクトースホエー透過物 0.1 g/v を添加した無菌グリシン (0.7 g/v) 増殖 5.0 l を含む 7.5 l のニューブルンスウィツタガラス発酵器 (New Brunswick glass fermentor) 内で実施した。低圧使用したエタノール 1.5 g/v および L-アラタクトノ-1.4 ラクトン 1.5 g の補足分を添加した。その後 pH 5.2 のこの無菌増殖に増殖 1 l 当たり酵母細胞ペースト (C. ノルベグンシス K00 M7-78) 150 g を細胞が混入しないようにして加えた。培養液濃度はニューブルンスウィツタガラスブローブで監視した酸素補給空気を用いて飽和の 30 g 程度に維持した。転化反応の期間中は攪拌を 350 rpm に設定し温度を 28℃ に保つた。生

過程の間エタノール濃度が 0.2 g/v へと低下し、以後は 0.2~0.5 g のエタノール濃度を保持するように定期的に補足した。L-アラタクトノ-1.4 ラクトン基質の濃度はその基質を 4~8 時間の間隔で添加することにより 1.2~1.5 g の範囲に保持した。

L-アスコルビン酸の生産は 60-4 B 電圧測定用ブローブと共にアミテックス (Ametek) HFX-B 5 型電圧計を用いる HPLC 分析によつて連続的に監視した。また、L-アスコルビン酸は 2,6-ジクロロインドフェノールを用いる酸化還元電位測定法によつても簡単に調べた。

生物転化方法の結果は、最初の 2 時間の遅延期後に 0.32 g/l/時の L-アスコルビン酸生産量を得られたことを示している。10 時間後にその生産量は 0.20 g/l/時 (10 時間) へと徐々に低下し、そして最後の 16 時間では 0.15 g/l/時に低下した。L-アスコルビン酸の最終的収量は上清プロセスにおいて 7.35 g/l であつた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 1 mg/ml 添加することによりプロセス中に存在する酵母細胞を溶解すると、最終濃度が 7.51 g/l に増大した。

#### 実施例 11

レッドスターベーカリー (Red Star baker) のビール酵母 (Saccharomyces cerevisiae; この酵母は L-アスコルビン酸過剰生産性でない) 907 g (2 ポンド) をザゴフ (Zagoroff) の方法 (ジエイ、バイオロ、ケム、(J. Biol. Chem.), 244, 5020 (1959) を参照) に従つて培養した。この増殖粉末 900 g を 0.4 M 硫酸、0.05 M トリス (ヒドロ

キシメチル) アミノメタン (トリス-HCl) pH 8.2 および 1 ミリモルのエタレンジアミン四酢酸 (EDTA) からなる溶液 1.5 l へ移した。この懸濁液の pH を水酸化ナトリウムで 7.5 に調整し、その後ブレンダーで 45 秒間ホモジナイズした。ホモジネートを 4℃ に置いて 15 分間 2500 x g で遠心分離し、細胞破片を捨てた。上清はシャープレス (Sharples) 遠心分離器を使って 62000 x g で遠心分離にかけた。沈殿物 (ミトコンドリア) を採取して 0.25 M 蔗糖および 0.01 M トリス-HCl pH 7.5 を含む溶液 250 ml 中に懸濁し、そして凍結した。

2 mM L-アラタクトノ-1.4 ラクトンおよび 50 mM クエン酸 Na pH 6.8 を含む反応混合物を全量 3 ml 用添した。この混合物を瓶とう器中 37℃ で 30 分までインキュベートした。50 g TCA 0.3 ml を加えることにより反応を止めた。析出した蛋白質を遠心分離で除去し、上清は電気化学的検出をともなう高圧液体クロマトグラフィーおよび 2,6-ジクロロインドフェノール測定を用いて L-アスコルビン酸について決定した。

代表的な決定を第 2 図に示す。この材料の比活性を計算すると  $2.5 \times 10^{-1}$  ミクロモル/分/時 (蛋白質) であつた。第 3 図に示すように最適温度は 37℃ であり、また第 4 図に示すように最適 pH は 6.8 であると決定された。反応速度定数  $k_m$  および  $V_{max}$  は 0.1~5.0 mM の範囲の L-アラタクトノ-1.4 ラクトン基質濃度を用いて決定した。その反応速度定数  $k_m$  は  $1.6 \times 10^{-2}$  M であり、反応速度定数  $V_{max}$  は 0.34 (ミクロモル/分) であると決定された (第 4.5 および 6 図を参照)。

無菌のミトコンドリア系についてこれらの反応速度定数を決

定した後、酵素活性をミトコンドリアから分離させることにより酵素をさらに精製した。この酵素を可溶化させるために超音波処理および各種の洗剤を試験した。

一連の5種の洗剤：すなわち 1) ノルフェノール P O E-9 (NFE-9), 2) ポリデクト (P-40), 3) オクタデルコソド, 4) [3-(3-コラインドプロビル)-ジメチルアンモニア] 1-プロパンスルホネート (CHAPS), および 5) [3-(3-コラインドプロビル)-ジメチルアンモニア]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート (2H<sub>2</sub>O) (CHAPSO) を試験した。CHAPSO が特に効果的であるとわかった。この結果を表1に要約する。さらに CHAPSO はミトコンドリアから酵素を選択的に分離させて、この状態で Nishikie らの場合よりも10倍大きい比活性を有する調製物を与えたアーク、バイオケム、アンドバイオフィズ、(Aron Biochem. & Biophys.) 191, 474 (1978) を参照。各種の酵素の特性の比較を表1に示す。

調 査		活性の比較		比 活 性 (単位/μg蛋白質)*
調 査		En (μM)	x 1000	
ビーム調製 (S. norvegicus)		1.6	1.5-4.9	
1,4-F29-(Red Star)				
文 献				
ニシキミ (Nishikie 5)		-	2.3	
0,9-チリス (C. stellae)		-	2.6-3.9	
(NRL Y-900)				
0,9-ルベグンリス (C. norvegicus)		1.3	2.1-3.3	
(CBB 1911)				
0,9-ルベグンリス (C. norvegicus)		-	6.6	
(NFE-42)				
0,9-ルベグンリス (C. norvegicus)		-	7.3-8.3	
(NFE-64)				

\* 1単位=1ミクロモル/分

\*1単位=1ミクロモル/分

表1の各調製の酵素のための最適温度および最適 pH はそれぞれ 37℃ および pH 6.8 であることがわかった。

酵素ミトコンドリアまたはさらに精製した酵素は、次の実験例に示すように、レーアスルビン酸の連続生産用の固定化レーラクトノ-1,4-ラクトンオキシダーゼカラムを作る際に用いられる。

#### 実験例 II

実験例Iで調製したミトコンドリア調製物 (蛋白質 1.1g を含む) 10 ml をアルギン酸 Na の 5% 溶液 50 ml と混合した。この混合物を18ゲージの針を通して 0.25 M 蔗糖、0.1 M CaCl<sub>2</sub> および 10 mM PIPES pH 6.8 からなる溶液 1 L の中に押し出して 4℃ で 24 時間産生した。これにより直径が 3 mm の均質なビーズを得た。

固定化ミトコンドリア酵素を使用する「パツナ式」生物転化を説明するために、蛋白質 0.11 g を含むビーズ 2 g を標準反応混合物 3 ml 中 37℃ で 20 分間振とうした。検定は上清中にレーアスルビン酸が 77 μg/ml 存在することを示した。

固定化ミトコンドリア酵素を使用する連続生物転化法を説明するために、0.9 × 30 cm のカラムにビーズを充填して 37℃ に保持した。2 mM レーラクトノ-1,4-ラクトンおよび 10 mM ビベラジノール、M<sup>+</sup> ベース [2-エタノールホスホン酸] (PIPES) pH 6.8 を含む供給液をカラムにポンプ注入した。3.2 ml/分の流量で 5 分後には供出液中のレーアスルビン酸が 5.3 μg/ml に増加した。

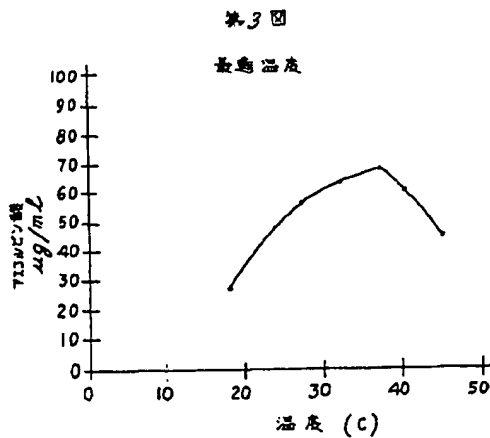
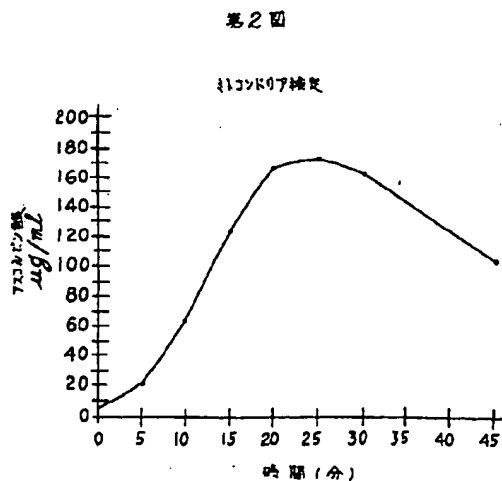
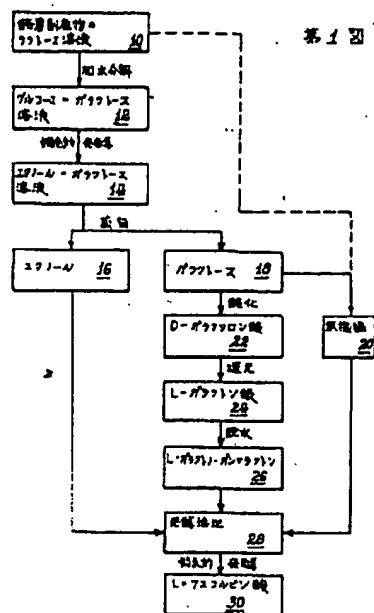
#### 実験例 X

カンダイド ノルベグソリス CBB 1911 およびカンダイド クチルス NRRL Y-900 の2種の酵母株を、レーラクトノ-1,4-ラクトンまたはレーラクトンクロン酸メチルエタールの2つの異なる基質のそれぞれを用いる別々の生物転化実験においてエタノール炭素源でもって利用した。この生物転化実験は好氣的条件下に生物転化用培地 50 ml を含む貯蔵容器の 500 ml フラスコ内で、200 rpm で運転の振とう器を使ってかきまぜながら 30℃ の温度で 48 時間実施した。0, ノルベグソリス用の培地はエタノール 1.5 g および基質 0.5 g を含む調整 5 M-1 培地であつた。0, クチルス用の培地はエタノール 1.5 g および基質 0.2 g を含む 5 M-1 培地であつた。結果は次の通りである。

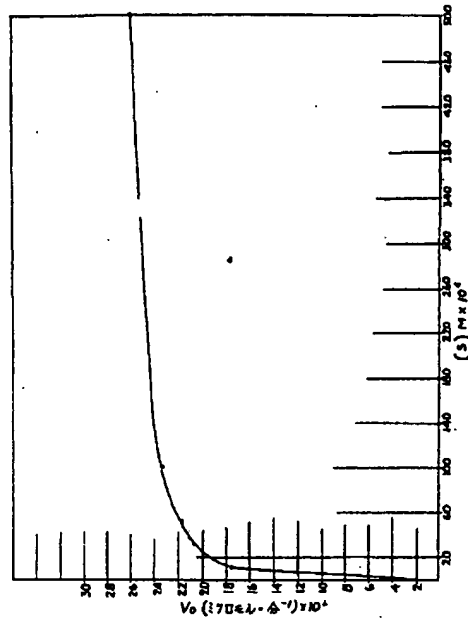
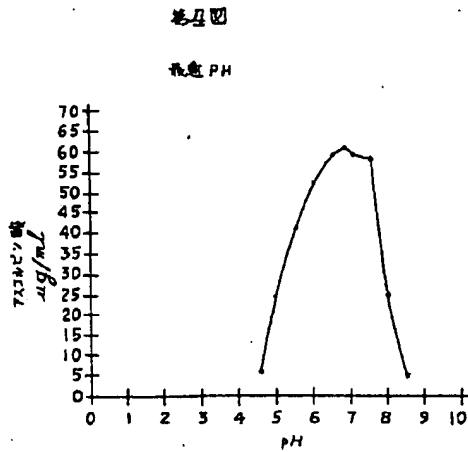
	CBB1911	CBB1911	NRRLY-900	NRRLY-900
基 質	1*	2**	1*	2**
光学密度	2.05	2.60	8.50	8.50
レーアスルビン酸 μg/ml***	9.28	3.5	50.0	12.0
他の酸化還元 化合物 μg/ml	10.1	17.5	1.8	1.3
全アスルビン酸 μg/100ml	10.625	473	15.905	4383

- \* レーガラタトノールモノラクトン  
 \*\* D-ガラクトフロン酸メチルエステル  
 \*\*\* アスコルビン酸は電気化学検出をともなう HPLC 分析  
 で測定した。

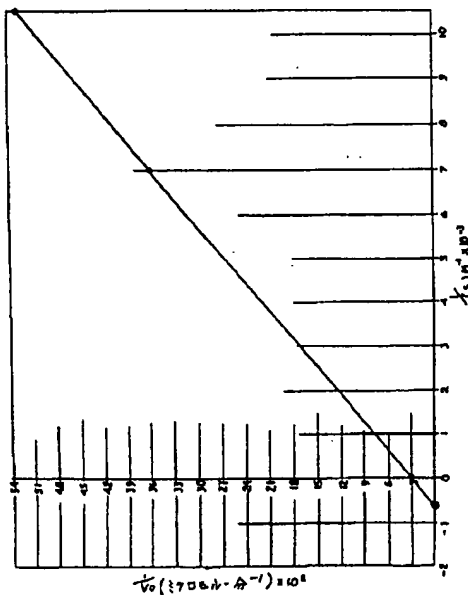
本発明により、アスコルビン酸製造のための有用かつ新規な方法、微生物および培養が提供されたことは先の記述より知られるであろう。本発明の種々の態を特定の実施態様に関して詳細に述べてきたが、いろいろな変更ならびに改良が本発明の範囲から明らかになるであろうし、これらもまた本発明の精神および範囲に含まれかつ次の請求の範囲に包含されるものである。



5



第5図



国際調査報告

International Search Report

IPC Class. 7/42; C12N 1/00; C12N 1/16; C12N 11/14

U.S. 435/135, 176, 177, 179, 182, 183, 190, 243, 247, 250, 252, 258

EA Search Database: 1972-1984  
LKFAT Database: 1975-1984

Category	Class of Document	Author, Title, Date, etc.	Relevant to Class No. 1
Y	N	Helick et al., Can. J. Microbiol. Vol. 18, 1972, pages 597-600	1-16, 19, 22-27
X	N	Blag et al., Eur. J. Biochem. Vol. 127, 1983, pages 391-396	1-4, 12, 16
Y	N	Blag et al., Eur. J. Biochem. Vol. 127, 1983, pages 391-396	1-15, 19, 22-27
Y	N	Koguchi et al., J. Biochem. Vol. 90, 1981, pages 33-38	1-15, 19, 22-27
X	N	Kianikini et al., Arch. Biochem. Biophys. Vol. 191, 1978, pages 479-486	1-15, 19, 22-27
Y	N	The Merck Index, Ninth Edition, Winhold et al., (ed.), 1976, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., pages 906 and 1054	10
Y	N	Handbook of Chemistry and Physics, Forty-Fifth Edition, Weast (ed.), 1968, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, pages B-126 - B-137	10

31 December 1984

ISA/US

10 JAN 1985

James Martinell

International Application No. PCT/US84/01695

From PETROLEUM (page 4) and ENR (page 10)

アメリカ合衆国イリノイ州80025, グレンビュー, グリーン・ウィ  
ロウ・レイン 1340, アパートメント・エイ  
アメリカ合衆国イリノイ州60046, レイク・ヴィラ, オーク・レイ  
ン・ドライブ 101



? S PN=JP 61500201  
S2 1 PN=JP 61500201  
? T S2/7

2/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

004283483

WPI Acc No: 1985-110361/198518

**Fermentative ascorbic acid prodn. from galactonic acid derivs. - using over-productive microorganisms esp. Candida norvegensis mutants**

Patent Assignee: KRAFT INC (KRFT ); ROLAND J F (ROLA-I)

Inventor: CAYLE T; DINWOODIE R C; MEHNERT D W

Number of Countries: 008 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 8501745	A	19850425	WO 84US1695	A	19841019	198518 B
EP 146239	A	19850626	EP 84307259	A	19841022	198526
JP 61500201	W	19860206	JP 84504007	A	19841019	198612
DK 8502802	A	19850620				198620
US 4595659	A	19860617	US 83543975	A	19831020	198627
US 4916068	A	19900410	US 85749538	A	19850618	199020

Priority Applications (No Type Date): US 83543975 A 19831020

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; A3...8646; No-SR.Pub; EP 50571; GB 2047268; US 4001437; US 4246348; US 4397949; WO 8100576

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 8501745 A E 52

Designated States (National): DK JP US

EP 146239 A E

Designated States (Regional): DE FR GB IT NL

Abstract (Basic): WO 8501745 A

Prodn. of L-ascorbic acid (I) comprises fermenting a medium contg.

(1) L-galactonic acid (II), its lower alkyl esters and/or L-galactono-gamma-lactone (III) as substrate and (2) EtOH and/or glycerol as C source with a (2)-utilising microorganism which is overproductive of (I) from these substrates. Culture is carried out under aerobic conditions.

In modifications, (III) is converted to (I) using immobilised L-galactono-1,4-oxidase, or the D-analogues of the substrates are used.

Microorganisms overproductive of (I) and able to transport (I) across cell and mitochondrial membranes are claimed.

USE/ADVANTAGE - (I) can now be prepd. from waste prods. of food processing. Yields of at least 1g/l and achieved with only minimal prodn. of (I) analogues, e.g. D-erythroascorbic acid.

0/6

Abstract (Equivalent): US 4916068 A

L-Ascorbic acid is produced by bioconversion using a L-galactano-1,4-oxidase enzyme from *Candida norvegensis* MF-56 (ATCC 20686), MF-78 (ATCC 20732) or related L-ascorbic acid overproducing mutant strain having activity of 6,600 micro-mol. per min. per mg protein.

Process comprises (a) immobilising the enzyme; (b) contacting it with aq. bioconversion medium contg. 2.0 mmol. or more of L-galactono-1,4-lactone; (c) maintaining O<sub>2</sub> level of 3.0 ppm or more in medium to enable conversion; and (d) recovering prod.

ADVANTAGE - Can be operated in conventional aerobic fermentation

modes, e.g. batch, continuous semicontinuous. (19pp)

US 4595659 A

Novel L-ascorbic acid mfr. comprises (a) forming an aq. fermentation medium contg. L-galactonic and/or at least one of its lower alkyl ester(s), L-galactono-gamma-lactone as substrate, ethanol, glycerol as C-energy source; (b) adding a Candida yeast or its mutant strain which is overproductive in L-ascorbic acid synthesis, which uses the C-source; and (c) aerobically culturing to consume C-source and accumulate prod.

Pref. medium contains an N-source, minerals for growth, and 0.5 wt.% or more of glycine to enhance prodn. at pH 2.5-6.5. Aerobic conditions comprise 20% or more O<sub>2</sub>-satn.

ADVANTAGE - Ethanol and substrate are derived from a dairy by-prod. lactose source or citrus pectin. (10pp)

Derwent Class: B03; D16; E13

International Patent Class (Additional): C12N-001/00; C12N-009/04; C12N-011/14; C12P-007/62; C12P-009/60; C12P-017/04; C12R-001/72

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**